

## Immunohistochemistry (IHC)

2021/06/10 권정원 업데이트

\*paraffin slide를 준비한다.

### 1. Deparaffinization 과정

Xylene 3분씩 2번 → Xylene : 100% ethanol = 1:1 3분 → 100% ethanol 3분씩 2번 → 95% ethanol 3분 → 70% ethanol 3분 → 50% ethanol 3분 → cold water 3분씩 2번

이 과정을 jar에 슬라이드를 옮겨가면서 Deparaffinization 한다.

### 2. Antigen retrieval

유리 jar에 Sodium citrate buffer (10mM sodium citrate, 0.05% tween 20, pH6.0) 증탕으로 미리 끓여놓고 조직을 넣어 20분간 끓인다.

3. 끓인 조직을 찬물에 10분간 담가 놓는다.

4. 다코펜으로 조직 주위에 원을 그린다.

5. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 로 10분간 endogenous peroxidase activity 를 막는다.

6. TBS with 0.025% Triton X-100 buffer로 washing 5분씩 2번

7. 10% FBS with 1% BSA in TBS로 상온에서 2시간 blocking 한다.

8. Primary antibody 을 1:200으로 1% BSA in TBS 에 희석하여 냉장에서 overnight 으로 붙인다. (슬라이드가 마르지 않게 wet chamber에서 incubation 시킴)

9. 다음날 TBS with 0.025% Triton X-100 buffer로 washing 5분씩 2번

10. Biotinylated Secondary antibody를 1:1,000으로 1% BSA in TBS 에 희석하여 상온에서 1시간 붙인다.

11. HRP 1:10,000으로 희석하여 30분 붙인다.

12. TBS로 rinse 5분씩 2번

13. DAB substrate solution으로 발색, substrate : buffer = 20 $\mu$ l : 1ml, 광학현미경으로 관찰하면서 발색이 될 때까지 붙인다. (3분-20분)

14. counterstaining

15. Xylene에서 10분 유지한 후 mounting solution으로 커버슬립 덮는다.